

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Prevalencia de la leptospirosis bovina en dos distritos
de la provincia de Puno - Puno**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTORA

Susana Silvinia Cachata Rivas

Lima – Perú

2006

CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE CUADROS.....	iii
RESÚMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
LEPTOSPIROSIS BOVINA	
2.1. Etiología.....	4
2.2. Epidemiología.....	5
2.3. Relación serovar – hospedero.....	14
2.4. Modo de transmisión y fuentes de infección.....	16
2.4.1. Factores asociados a la infección.....	18
2.5. Patogenia e inmunidad.....	21
2.6. Signos clínicos.....	24
2.6.1. Forma aguda.....	24
2.6.2. Forma subguda.....	25
2.6.3. Forma crónica.....	25
2.7. Diagnóstico.....	26
2.7.1. Diagnóstico epidemiológico.....	26
2.7.2. Diagnóstico clínico.....	27
2.7.3. Diagnóstico laboratorial.....	28

2.7.4. Diagnóstico histopatológico.....	31
2.7.5. Diagnóstico diferencial.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. Población y área de estudio.....	34
3.2. Toma de muestras.....	35
3.3. Procesamiento de las muestras.....	36
3.3.1. Prueba de aglutinación microscópica (MAT).....	36
3.3.2. Antígeno utilizado.....	37
3.3.3. Tamizaje.....	38
3.3.4. Titulación de anticuerpos.....	39
3.4. Análisis de datos.....	40
4. RESULTADOS.....	41
5. DISCUSIÓN.....	44
6. CONCLUSIONES.....	48
7. RECOMENDACIONES.....	49
8. BIBLIOGRAFÍA.....	50

LISTA DE CUADROS

Pag.

Cuadro N° 1. Distribución de bovinos reactivos a leptospirosis de acuerdo a la prueba de Microaglutinación (MAT). Puno. 2005.....41

Cuadro N°2. Distribución de bovinos reactivos a leptospirosis, según edad, mediante la prueba de microaglutinación. Illpa-INIA, Paucarcolla. Puno. 2005.....42

Cuadro N° 3. Distribución de bovinos reactivos a leptospirosis, según edad, mediante la prueba de Microaglutinación. Granjas Cárdenas. Mañazo-Puno. 2005.....43

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con muestras de suero de 103 bovinos (98 hembras y 5 machos), predominantemente de la raza lechera Brown Swiss, criados en la provincia y departamento de Puno; con la finalidad de estimar la prevalencia de leptospirosis y ver su posible asociación con las variables edad y lugar. Los animales procedían de la Estación Experimental Illpa-INIA (Paucarcolla) y de la Ganadería Cárdenas (Mañazo). La colecta de muestras se realizó durante los meses de febrero y marzo (época de lluvia) del 2005. Los sueros fueron enfrentados a una batería de referencia de 4 serovares de *Leptospira interrogans* mediante la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT). Anticuerpos leptospirales en títulos $\geq 1:100$ fueron detectados en 3 muestras de suero procesados, representando una prevalencia de 2,91%. De los sueros de animales procedentes de la EE Illpa-INIA se detectaron dos positivos a leptospirosis, representando una prevalencia específica de leptospirosis de 2,74 %; mientras que en la ganadería Cárdenas, sólo se encontró un animal reactor, significando una prevalencia específica para el lugar de 3,33 %. En los tres casos indicados, el serovar involucrado fue *Leptospira icterohaemorrhagiae*, siendo el título máximo de 1:200, obtenido en una hembra de 5 meses de la ganadería Cárdenas. Los títulos mínimos fueron de 1:100, obtenidos de dos hembras de 2 y 4 años procedentes de la EE Illpa-INIA.

Palabras clave: Leptospirosis, bovinos, serología, microaglutinación, prevalencia.

SUMMARY

To estimate the prevalence of bovine leptospirosis and the possible association with age and procedence of a study involving 103 sera samples were performed. Samples from 98 female and 5 male Brown Swiss raised in the province of Puno-Puno were obtained. The animals came from the Illpa-INIA experimental station (Paucarcolla) and the Cardenas cattle farm (Mañazo). A sample collection during february and march (rainy season) was performed. Sera samples of 4 serovar reference set of *Leptospira interrogans* by the MAT were tested. Two positive samples (2,74% of specific prevalence) from the Illpa INIA station and one (3,33 % of specific prevalence) from the Cardenas farm were detected. The three positive cases represented a total prevalence of 2,91%. *Leptospira icterohaemorrhagiae* was the serovar involved in all three cases. Antibody titers of 1:200 from a 5 month old female from the Cardenas cattle farm and of 1:100 from two females of 2 and 4 years old from the Illpa-INIA station were found.

Keywords: Leptospirosis, bovine, serology, microagglutination, prevalence.

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis infecciosa de distribución mundial, considerada una enfermedad reemergente (Zuerner y Bolin, 1997). Es de origen bacteriano y afecta a la mayoría de los mamíferos domésticos y silvestres, incluyendo al hombre, a quien se le considera un hospedador accidental. En los animales de importancia económica constituye una de las enfermedades de mayor relevancia, en particular los bovinos, por ocasionar pérdidas económicas significativas debido a la infertilidad, abortos, natimortos y nacimiento de crías débiles (Tirado, 2005; Orrego, 2005). Puede ser causada por cualquiera de las espiroquetas del género *Leptospira*, especie *Leptospira interrogans*, clasificándosele de acuerdo a sus características antigénicas en serogrupos y serovariedades de las que se han descrito más de 220 (Luna *et al*, 2005).

Según Thiermann (1984), citado por Alonso *et al.* (2001), la infección en bovinos se produce principalmente por un número limitado de serovariedades endémicas en una región o país y además, su presencia está íntimamente ligada a una serie de factores ecológicos y medioambientales.

Los estudios realizados en diferentes partes del mundo indican que la distribución de la leptospirosis bovina es universal, las condiciones climáticas pueden favorecer su presentación; sin embargo, el impacto se aprecia con mayor frecuencia en áreas tropicales y subtropicales, donde se presentan durante todo el año; en áreas templadas y en forma estacional durante los meses en que se

registran altas temperaturas y lluvias, mientras que en regiones áridas debido a las condiciones existentes, se presenta cerca de sitios donde existe agua y una alta concentración animal (Luna *et al.*, 2005).

En el ganado bovino, la leptospirosis produce pérdidas económicas de manera primaria por sus efectos sobre la reproducción, pudiendo aparecer mortinatos, abortos y/o nacimiento de animales débiles e infertilidad (Ellis, 1994). Las pérdidas por este concepto, resultan de difícil estimación, básicamente por dificultades inherentes al diagnóstico de la enfermedad (Thiermann, 1984; citado por Alonso *et al.*, 2001).

De manera secundaria, también puede haber pérdidas económicas como consecuencia del “Síndrome de caída de la leche” o agalactia transitoria producida por este microorganismo (Ellis, 1983; citado por Alonso *et al.*, 2001). Por último, en animales jóvenes puede darse, aunque en poca frecuencia, un cuadro agudo grave que cursa con fiebre, ictericia, hemorragias y hemoglobinuria, que frecuentemente es de curso fatal (Alonso *et al.*, 2001).

El ser humano no actúa como hospedador de mantenimiento de ningún serovar, por lo que la infección será siempre accidental, particularmente cuando desempeña actividades tales como: Médico Veterinario, ganadero, trabajador pecuario, matarife, trabajos en agricultura y minería (Faine, 1982; citado por Lugo *et al.*, 2001).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de la leptospirosis bovina en una parte del altiplano peruano. Si bien, se han desarrollado estudios similares en camélidos sudamericanos criados en el departamento de Puno, en nuestro país no se cuenta con información sobre la situación de la leptospirosis bovina en esta región; sobre todo, teniendo en cuenta que la especie bovina constituye uno de los más importantes reservorios de esta enfermedad.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

LEPTOSPIROSIS BOVINA

2.1 Etiología

La leptospirosis bovina es ocasionada por microorganismos del género *Leptospira*, constituida por bacterias con forma de hélice flexible, de una longitud de 6 a 20 μm y un diámetro de 0.1 μm ., teniendo uno de sus extremos, forma típica de gancho. No es fácil observar las leptospiras con el microscopio óptico mediante las tinciones habituales, debido a su pequeño diámetro y a la dificultad de fijar y colorear estos microorganismos. Por ello, se hace preciso recurrir al microscopio de campo oscuro o de contraste de fases. Poseen dos endoflagelos, lo que hace que estas bacterias sean móviles, actividad que llevan a cabo a través de tres formas principales de movimiento: traslación, flexión y rotación. Además, en medios semisólidos pueden realizar movimientos de perforación. Son microorganismos aerobios y quimioorganótrofos; utilizan como fuente de carbono y energía largas cadenas de ácidos grasos o largas cadenas de alcoholes grasos, y no emplean hidratos de carbono ni aminoácidos como fuente de energía (Vadillo *et al.*, 2002).

La resistencia de las leptospiras en el medio ambiente externo es escasa, a no ser que se encuentre en un medio acuoso ligeramente alcalino o neutro. Son muy sensibles a la desecación, a los ácidos, al fenol, a los detergentes y a los desinfectantes. En algunas ocasiones pueden resistir la congelación pero no es frecuente. Resisten tratamientos térmicos de 50-55 °C durante 30 a 60 minutos.

Se caracterizan por ser oxidasa, peroxidasa y catalasa positivas. Pueden elaborar hialuronidasa, fibrinolisin, lipasas y hemolisinas (Vadillo *et al.*, 2002). El microorganismo es susceptible a la sequedad y un pH inferior a seis o superior a ocho es inhibitorio, una temperatura ambiental inferior a 7 °C o superior a 36 °C es perjudicial para su supervivencia (Radostits *et al.*, 2002)

Dentro del género leptospira se diferencian 2 especies, una patógena (*L. interrogans*) y otra saprofita (*L. biflexa*), siendo la especie más importante desde el punto de vista de la Medicina Humana y Veterinaria *Leptospira interrogans* (Vadillo *et al.*, 2002).

2.2 Epidemiología

La leptospirosis es considerada una antropozoonosis de amplia distribución mundial (WHO, 1999). El estudio de la epidemiología es complejo debido al gran número de factores que influyen en su presentación, lo cual dificulta la extrapolación entre las diferentes regiones geográficas y obliga al conocimiento individualizado de cada continente, país o región. Las distintas cepas patógenas de *Leptospira* pueden afectar potencialmente a los mamíferos, donde algunos actuarán como hospedadores de mantenimiento o accidental en función del serovar considerado (Sandow y Ramírez, 2005).

Las leptospiras patógenas se clasifican en una especie denominada *Leptospira interrogans* que contiene 220 serovariedades, distribuidas en 23 serogrupos (Luna *et al.*, 2005). En las vacas, la leptospirosis puede ser ocasionada por serotipos sin

especificidad de hospedador como *Leptospira pomona*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira canicola* o por serotipos con especificidad de hospedador como *Leptospira hardjo* (Rebhun, 1999).

Existen muchos reservorios domésticos y salvajes de *L. interrogans* que pueden eliminar el organismo al ambiente ocupado por las vacas. Resulta difícil inculpar a una sola especie en todos los casos, por que la mayoría de los serotipos no están adaptados al hospedador. Los perros, los cerdos, las ratas, los ratones, los caballos, los ciervos y otros animales salvajes pueden contaminar el ambiente de las vacas sensibles (Rebhun, 1999). La especie bovina se ve más seriamente afectada por la leptospirosis por que conjuntamente con las ratas constituyen los más importantes reservorios (Acosta *et al.*, 1994), esto se explica por que el pH alcalino de la orina de estas especies favorece la sobrevivencia de la leptospira, de tal manera que un mililitro de orina de vaca puede contener hasta 100 millones de microorganismos (Gillespie y Ryno, 1963), mientras que el hombre tiene una orina relativamente ácida para la leptospira, considerándolo por ello un mal reservorio (Okazaki y Ringen, 1975).

La leptospirosis es una causa importante de pérdida económica en los animales de granja. La mayoría de la infecciones por leptospirosis son subclínicas y están asociadas con infecciones fetales que causan abortos, mortinatos y el nacimiento de neonatos débiles con un índice alto de mortalidad en los bovinos, ovinos, equinos y porcinos. En los bovinos, las epidemias de abortos, esterilidad y el aumento de números de animales desechados causan pérdidas económicas

importantes. Las epidemias de agalactia en los rebaños lecheros, **el síndrome hipogaláctico**, es asociada con la infección por *L. hardjo* (Radostits *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista de salud pública, la importancia de la leptospirosis, se sustenta en que es una zoonosis relevante, asociada a riesgo laboral para las personas que realizan tareas que involucran el contacto directo o indirecto con animales o productos animales, así tenemos a los Médicos Veterinarios y al personal que trabajan en las alcantarillas, los porquerizos, los camales y las granjas. También se encuentran en situación de riesgo las personas que habitan viviendas infestadas por roedores (Joklin *et al.*, 1997, Radostits *et al.*, 2002).

En relación a la frecuencia de presentación de leptospirosis animal, se han realizado diversos estudios en diferentes especies; así, en México, Moles *et al.*, (2002), llevaron a cabo un estudio serológico para detectar leptospirosis bovina. Se analizaron resultados de 4043 sueros de bovinos provenientes de distintas regiones, que fueron remitidos a un laboratorio de diagnóstico. Se empleó la técnica de aglutinación microscópica. El análisis indicó 31.1% de seroprevalencia y las serovariedades más frecuentes fueron *L. hardjo* (cepa H 89 aislada en México), *wolffi* y *tarassovi*. Se concluyó que no existe variación importante en la prevalencia obtenida en un estudio previo realizado en el año de 1994 en ese país.

En ese mismo país, en 1991 se realizó un estudio para la detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en bovinos de hatos lecheros del valle

de Atlixco, Puebla, usando la prueba de aglutinación microscópica. De un total de 116 animales 98 (84.48%) resultaron positivos y 18 negativos (15.52%). Casi todos los sueros resultaron positivos contra más de una serovariedad (Fernández *et al.*, 1993).

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias realizó un estudio retrospectivo (1991-2003) de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las diferentes regiones ecológicas, dando como resultado en la región de clima templado (temperatura promedio de 0-30°C y una precipitación pluvial de 300 a 4 000 mm) una frecuencia promedio de leptospirosis de 39.4% con un rango de 22,1 a 54,3%. Las serovariedades con mayor prevalencia fueron la cepa Palo Alto (*Icterohaemorrhagiae*), cepa Sinaloa ACR (*portland-vere*), *Bratislava*, *Pyrogenes*, *Pomona*, cepa H-89 (*Hardjoprajitno*), *Hardjo*, *Wolffi* y *Tarassovi* (Luna *et al.*, 2005).

Por otro lado, entre noviembre de 1997 y febrero de 1998, Ochoa *et al.*, (2000) efectuaron un estudio epidemiológico de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria perteneciente al municipio de Don Matías, norte del departamento de Antioquia, Colombia; en una zona de clima frío donde existe un sistema de producción “cerdos-pastos-leche” que utiliza el estiércol de cerdo como fertilizante de las praderas de pastoreo. Se estudiaron 23 granjas y se obtuvieron muestras de sangre de 67 operarios de lechería y porcicultura, de 174 vacas en producción y 68 cerdos de ceba y 214 de cría. Se empleó la prueba de microaglutinación (MAT) para seis serotipos de *Leptospira*. La prevalencia de

individuos reactivos fue de 22.4% en los operarios, de 60.9% en las vacas en producción, de 10.3% en los cerdos de ceba y de 25.7% en los cerdos de cría. Se encontró una alta prevalencia de infectados por *Leptospira* (serotipos *Pomona*, *Bratislava* y *Hardjo*) en este sistema de producción en el que existen condiciones favorables para la transmisión de este microorganismo en las diferentes especies animales y en los humanos.

En nuestro país podemos indicar que en el año 1989, se efectuó un estudio serológico en alpacas de la SAIS Picotani, provincia de Azángaro, departamento de Puno; de los 50 sueros de alpacas obtenidos el 100% presentaron anticuerpos a uno o más serovares de *Leptospira*. Se comprobó que 35 (70%) presentaban anticuerpos a *L. castellanis* (Castellon 3) del serogrupo Ballum, 5 (10%) a *L. shermani* (LT-821) del serogrupo Shermani, 3 (6%) a *L. icterohaemorrhagiae* (RGA) del serogrupo Icterohaemorrhagiae, 4 (8%) a *L. andamana* (CH-11) del serogrupo Andamana de la especie *L. biflexa* y 3 (6%) mostraron reacciones múltiples a *L. castellanis* (Castellon 3) del serogrupo Ballum, *L. grippityphosa* (Moskva V) del serogrupo Grippityphosa y *L. bataviae* (van Tienen) del serogrupo Bataviae (Macedo y Hung, 1993).

Entre los años de 1993 y 1996, Herrera *et al.*, (2000) llevaron a cabo un estudio serológico para determinar la seropositividad a leptospirosis en alpacas criadas en el altiplano peruano asociado con el índice pluviométrico. El objetivo de estudio fue determinar las diferencias, respecto a las seroprevalencias, en la época de seca y época de lluvias. Se muestrearon animales de 4 haciendas diferentes,

obteniéndose resultados que variaron desde un 0.0% de seropositividad en una de las haciendas hasta un 23.7 % en otra (época de lluvias). De un total de 810 animales muestreados reaccionaron positivamente 53 (6.54%) para por lo menos una variante serológica de las 24 utilizadas, de estas *L. pomona* fue la más frecuente (79.24%). Se concluyó que hubo variaciones significativas en los resultados entre la época de seca y la de lluvias.

La especie canina es una de las más susceptibles a la leptospirosis, sobre todo los animales no inmunizados, convirtiéndose en portadores de leptospiras; por este motivo el año 1997, Salamanca-Pinto (1999) realizó un estudio serológico en 60 perros vagabundos de la ciudad de Arequipa, para estimar la presencia de leptospirosis canina debido a la existencia de una población abundante de roedores, reservorios naturales de leptospiras patógenas. La evaluación se efectuó mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT), utilizando una batería de 17 variantes serológicas vivas, obteniéndose 9 sueros positivos (15%) con títulos de anticuerpos de 1:100. en la población muestreada, 10 % de los caninos fueron reactivos a *L. icterohaemorrhagiae*; 1,67% a *L. pyrogenes* y 3,33% presentaron reacción múltiple a *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pyrogenes*.

En 1997, se realizó un estudio sobre la frecuencia de *L. interrogans* en unidades de producción porcina del altiplano mexicano, siendo muestreadas cerdas de granjas tecnificadas (114 animales) y de explotaciones de traspatio (50 animales). De las 8 serovariedades detectadas 7 se encontraron en granjas tecnificadas y sólo 3 en animales de traspatio; quizá debido a la mayor densidad poblacional. La

serovariedad *bratislava* se halló en 28% de las hembras de granjas tecnificadas y de traspatio, y *panama* en 24.5% y 34% de las cerdas, respectivamente, y en menor proporción el resto de las serovariedades (Moles *et al.*, 1998).

El Ministerio de Salud del Perú, dentro de su programa de vigilancia del Síndrome Febril Icterohemorrágico Agudo, realizó un estudio en 1998 en la comunidad de Koribeni, provincia de La Convención, departamento de Cusco; a fin de estimar la seroprevalencia de la infección por leptospira en humanos y animales. Para el estudio se tomaron muestras de animales domésticos, peridomésticos, capturándose ratas y marsupiales. Las muestras fueron procesadas en el Instituto Nacional de Salud mediante las pruebas de aglutinación macroscópica (tamizaje) y aglutinación microscópica (MAT). Para los cultivos se usó medio Fletcher. De 164 muestras humanas, 41 (25%) presentaron anticuerpos contra *Leptospira interrogans*. El serovar prevalente fue Autumnalis (31%) seguido de Djasiman (11%), Bataviae (9,25%) y otros (48,75%). En 33 muestras de sangre canina, 12 (36,4%) fueron positivas, el serovar prevalente fue Autumnalis (27,8%) seguido de Australis (16,6%), Pomona (16,2%) y otros (39,4%). Los cultivos de las muestras obtenidas de los animales fueron negativos. El serovar Autumnalis fue prevalente en humanos y canes, llamó la atención la ausencia del serovar Canícola (Pachas *et al.*, 2001).

Sepúlveda *et al.*, (2002), realizaron un estudio en México, para conocer la importancia que las ratas y los perros tienen en la diseminación de la leptospirosis en granjas y establos establecidos en la ciudad Guzmán, Jalisco. Se utilizaron 13

serovariedades de *Leptospira interrogans* en la prueba de microaglutinación en placa (MAT). Se estudiaron 354 ratas (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) atrapadas en explotaciones pecuarias del lugar, 22 (6.2%) resultaron positivas y 34 (9.6%) sospechosas; asimismo, se estudiaron 419 perros de la región, 22.6% (95 perros) fueron positivos y 5.7% (24) sospechosos a *L. interrogans*. Con estos resultados se observó que ambas especies son importantes en la diseminación de la enfermedad dentro de las explotaciones pecuarias.

Céspedes *et al.* (2003), llevaron a cabo un estudio para estimar la prevalencia de leptospirosis y los factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en localidades dedicadas a actividades mineras (lavaderos de oro) y la prevalencia de la infección en perros en la provincia de Manu, departamento de Madre de Dios, Perú. Se tomaron 71 muestras de sangre de personas con antecedentes de fiebre, provenientes de cinco localidades dedicadas a la actividad minera, en ellos se evaluaron la presencia de anticuerpos IgM e IgG contra leptospira en suero por el método de ELISA y la prueba de microaglutinación (MAT). Además, se tomaron muestras de sangre a 27 perros que fueron evaluadas por MAT. De las 71 personas muestreadas 26 (36,6%) pobladores presentaron anticuerpos contra leptospira, siendo el serovar Georgia el más frecuente seguido de Bratislava. Se menciona como uno de los factores asociados a la infección el contacto con perros. De los 27 canes muestreados, 18 (66,6%) tuvieron serología positiva a leptospirosis. Los serovares más frecuentes fueron Georgia (44,4%) y Bataviae (33,3%), seguidos de javanica, australis, tarassovi, autumnalis y canicola (22,3%).

Con el fin de estimar la prevalencia de anticuerpos contra leptospira en personas asintomáticas en las localidades dedicadas al comercio y la agricultura de la provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, Céspedes *et al.*, (2004) efectuaron un estudio en el que se tomaron muestras de suero de 364 pobladores de 4 localidades, en quienes se evaluó la presencia de anticuerpos totales contra leptospirosis en suero por el método de ELISA y la prueba de microaglutinación (MAT). De estos, 114 (31,3%) presentaron serología positiva siendo los serovares más frecuentes bratislava y georgia según MAT. De la misma manera se tomaron muestras de suero de 374 canes, encontrándose que el 52,2% (181 canes) arrojaron serología positiva a leptospirosis. Los serogrupos más frecuentes encontrados en estos animales fueron: *L. canicola* (33,7%), *L. icterohaemorrhagiae* (25,97%) y *L. pyrogenes* (23,7%), así mismo se encontraron anticuerpos contra otros serovares como Hebdomadis, Ballum, Australis, Autumnalis, Djasiman y otros serovares en menor proporción.

Taype (2000), encontró un 50% de animales seropositivos en una muestra aleatoria simple del ganado (bovinos, ovinos y porcinos) perteneciente al Hospital de Apoyo N° 2 de Ucayali y un 79% (seropositivos) de 61 animales pertenecientes a la población circundante a dicho hospital, predominando los serotipos pomona e icterohaemorrhagiae.

La leptospirosis ha sido detectada serológicamente y por aislamiento de la bacteria en muestras provenientes del hombre, animales domésticos y salvajes de la costa, sierra y selva peruana, indicando que esta bacteria está ampliamente

distribuida en los diferentes ecosistemas del país. De todas las áreas geográficas, la selva presenta mejores condiciones ecológicas y por lo tanto abundantes reservorios para la sobrevivencia de las leptospiras (Liceras de Hidalgo, 1981)

2.3 Relación serovar-hospedador

La epidemiología de la leptospirosis se comprende más fácilmente al clasificar esta enfermedad en dos categorías amplias: leptospirosis adaptada al hospedador y no adaptada. Un animal infectado con una serovariedad del microorganismo adaptada al hospedador es un hospedador de mantenimiento o “reservorio”. La exposición de los animales susceptibles a las serovariedades no adaptadas al hospedador produce una enfermedad accidental o incidental (Radostits *et al.*, 2002).

Un hospedador de mantenimiento se caracteriza por:

- Susceptibilidad alta a la infección.
- Transmisión endémica en la especie del hospedador.
- Patogenicidad relativamente baja para su hospedador.
- Tendencia a sufrir una enfermedad crónica, en lugar de aguda, produciendo pérdidas económicas insidiosas debido a las pérdidas reproductivas.
- Persistencia de la serovariedad en los riñones y a veces, en el aparato genital.
- Respuesta de anticuerpos baja frente a la infección, que dificulta el diagnóstico.

- Eficacia baja de la vacunación para prevenir la infección.

Las serovariedades de leptospiras comunes y sus hospedadores de mantenimiento son los siguientes:

Hardjo bovis (América del Norte): bovinos.

Hardjo prajitno (Europa): bovinos.

Bratislava: porcinos, equinos.

Pomona (kennewicki): porcinos, mapache, zarigüeya.

Grippotyphosa: mapache, zarigüeya, ardilla.

Icterohaemorrhagiae: rata marrón.

Por el contrario un hospedador incidental se caracteriza por:

- Susceptibilidad relativamente baja para la infección, pero una patogenicidad alta para el hospedador.
- Tendencia a sufrir una enfermedad aguda en lugar de crónica.
- Transmisión esporádica en la especie del hospedador y adquisición de la infección de otra especie, a menudo en forma epidémica.
- Fase renal corta.
- Respuesta de anticuerpos intensa frente a la infección, facilitando el diagnóstico.
- Las vacunas son más eficaces para prevenir la infección.

Serovariedades comunes de leptospiras y sus hospedadores accidentales:

Hardjo: ovinos, ser humano.

Pomona: ovinos, bovinos.

Grippytyphosa: ovinos, bovinos.

Icterohaemorrhagiae: bovinos, porcinos.

Los terneros y los corderos son muy susceptibles a la infección y es muy probable que se produzca septicemia (Radostits *et al.*, 2002).

2.4 Modo de transmisión y fuentes de infección

El modo más frecuente de transmisión en el caso de serovares adaptados como *Hardjo*, es la transmisión horizontal directa, mientras que la transmisión horizontal indirecta tiene un papel más importante en las infecciones accidentales y se produce tras la exposición del animal a un ambiente contaminado con material infectante (Ellis, 1994).

La transmisión por contacto directo puede producirse de diversas maneras, siendo una de las más importantes la entrada de leptospiros por vía inhalatoria o conjuntival, procedentes de núcleos goticulares formados por la dispersión de la orina de animales infectados. Esto es debido a que los hospedadores de mantenimiento de un determinado serovar eliminan gran cantidad de microorganismos en su orina durante un período de tiempo prolongado, por lo que las gotículas de orina tendrán una alta concentración de gérmenes. Este hecho unido a la alta receptividad de los hospedadores de mantenimiento a la infección

por el serovar adaptado, supone que esta forma de transmisión juegue un papel principal (Alonso *et al.*, 2001).

Otra forma de transmisión directa sería la venérea. Aunque la presencia de leptospiras en el semen y tracto genital del toro ha sido observado (Van der Hoeden, 1958 y Ellis *et al.*, 1986; citados por Alonso *et al.*, 2001), la transmisión sexual no ha sido plenamente demostrada en el ganado bovino, si bien se supone que es una de las más importantes para las cepas del serovar *hardjo* genotipo Hardjoprajitno (Ellis 1994). En cambio, se sabe que es una vía fundamental en otras especies cuyos hábitats se encuentran en áreas de características climáticas o de densidad poblacional desfavorables para la transmisión de la enfermedad de manera indirecta (Little, 1986; citado por Alonso *et al.* 2001).

La transmisión indirecta juega un papel más destacado en el caso de infecciones por serovares accidentales. La forma de transmisión más frecuente tanto en el hombre como en los animales, es el contacto de la piel o mucosas con agua o barro contaminados con orina infectada. Por último, diferentes autores han evaluado la hipótesis de que los artrópodos podrían jugar un papel relevante en la transmisión de la leptospirosis. Así, se cree que las moscas, las garrapatas, las pulgas, los ácaros y los piojos pueden ser transmisores mecánicos de la infección (Michna, 1970; Amatredjo y Campbell, 1975; citados por Alonso *et al.*, 2001).

Además de lo anteriormente descrito, se ha demostrado la existencia de una transmisión vertical, tanto por vía transplacentaria como por vía galactófora (Amatredjo y Campbell, 1975; citados por Alonso *et al.*, 2001).

Por tanto, las fuentes de infección más frecuentes para el ganado bovino constituyen: la orina (Van der Hoeden, 1958; Michna, 1970; citados por Alonso *et al.*, 2001), la leche (Van der Hoeden, 1958; Prescott, 1993; citados por Alonso *et al.*, 2001), las descargas postparto (Timoney *et al.*, 1988; Ellis, 1983; citados por Alonso *et al.*, 2001) y el agua y pastos contaminados con estos materiales procedentes de animales infectados. Las leptospiras dependen de la existencia de una humedad relativa alta para su supervivencia en el medio ambiente, siendo ésta una condición indispensable para el mantenimiento de la infección por serovares accidentales en una región geográfica determinada (Covalada *et al.*, 1953; Van der Hoeden, 1958 y Prescott, 1993; citados por Alonso *et al.*, 2001).

2.4.1 Factores asociados a la infección

En la infección por leptospiras existen una serie de factores asociados que se deben considerar, siendo éstos, tanto factores dependientes del agente etiológico, como factores dependientes del hospedador y del medio en el que se encuentra este hospedador.

A. Factores dependientes del agente etiológico

El de mayor importancia es el relativo a la resistencia de las leptospiras fuera del hospedador. Son microorganismos bastante sensibles a las

condiciones ambientales (Van der Hoeden, 1958; Michna, 1970; citados por Alonso *et al.*, 2001) y los factores que determinan su supervivencia en el medio ambiente son: temperatura templada, ambiente húmedo, pH neutro o ligeramente alcalino y presencia de materia orgánica. Por tanto, las áreas con lagunas, riachuelos y bebederos en general, que congregan a un gran número de animales, son las que más frecuentemente están implicadas en los focos de leptospirosis (Ellis, 1994; Thiermann, 1984; citado por Alonso *et al.*, 2001). Estos factores van a propiciar la existencia de una cierta estacionalidad en la presentación de la enfermedad, en relación principalmente con la época de lluvias (Carrol y Campbell, 1987; Miller *et al.*, 1991).

B. Factores dependientes del hospedador

Diferentes autores destacan como factores más importantes la edad, el estado inmunitario y la gestación. La edad de los animales parece estar en relación con el estado de portador renal. Algunos autores sugieren que la mayor incidencia de animales que excretan leptospiras en la orina aparece en terneros y que la mayoría de las vacas mayores de tres años no son leptospirúricas (Ellis, 1983; citado por Alonso *et al.*, 2001). Respecto al estado inmunitario, se puede decir que, en general, el ganado expuesto a la infección es refractario a la reinfección durante años, incluso cuando los niveles de anticuerpos circulantes apenas alcanzan un título de 1:10 (Van der Hoeden, 1958; Ellis, 1983; citados por Alonso *et al.*, 2001). Por último, el aborto por leptospirosis se produce principalmente entre los 6 y 9 meses

de la gestación. Probablemente, la infección se produce varias semanas antes y el aborto tiene lugar 1 a 6 semanas después de la fase aguda en caso de serovares accidentales y de 4 a 12 semanas en caso de *hardjo*, aunque los animales no suelen mostrar signos de infección aguda. En infecciones por el serovar *hardjo* se han observado abortos en otros estadios, e incluso mortalidad embrionaria (Ellis y Michna, 1977).

C. Factores dependientes del medio ambiente

Destacan, principalmente, el manejo y el tipo de alimentación. Los casos de leptospirosis parecen ser más frecuentes y de peor pronóstico en las explotaciones de leche que en las de carne. Esto es debido, principalmente, a que el ganado bovino lechero se explota generalmente en sistemas intensivos o semiintensivos que llevan a un mayor hacinamiento, lo cual favorece la transmisión. Además, las crías suelen separarse de las madres, tras el parto, manteniéndose aisladas del rebaño y no introduciéndolas en el núcleo principal del mismo hasta su primera gestación. Esto supone la introducción constante de animales no expuestos, totalmente receptivos a la infección y que pueden infectarse en los momentos de mayor riesgo, haciendo que las tasas de infección más altas se produzcan entre los 2-3 años de edad (Ellis y Michna, 1976a, Ellis y Michna, 1976b; Leonard *et al.*, 1993). La alimentación parece ser un factor importante en relación con la eliminación de leptospiras en la orina. Leonard *et al.* (1992) y Leonard *et al.* (1993), demostraron que, en los animales alimentados con ensilados de granos, como suplemento, se producía una baja del pH de la orina, cuyo

efecto inmediato parecía ser la disminución del número de leptospiras viables eliminadas en este fluido.

2.5 Patogenia e inmunidad

Las leptospiras son muy invasivas debido a la producción de enzimas o a factores mecánicos, como la motilidad por excavación y a su tropismo orgánico. Ambas causas se han sugerido como mecanismos por los que éstas alcanzan sitios normalmente protegidos del organismo, como el líquido cefalorraquídeo y el ojo. La capacidad de producir lesiones de estos gérmenes puede ser debida a factores tóxicos (hemolisina, fibrolisinas, lipasas) y endotoxinas (catalasa, hialuronidasa) (Pumarola, 1994; Rodrigues-Torres, 1994; Ginebra, 2001; citados por Sandow y Ramírez, 2005).

Las leptospiras penetran en el organismo animal mediante la ingestión de los alimentos contaminados o agua; a través de las membranas mucosas de ojo, boca, fosas nasales, vagina y pene, o a través de la piel dañada o reblandecida por el agua, piel escoriada (Ellis, 1994). El agente se difunde a partir del punto sin dejar lesión, invadiendo al torrente sanguíneo, multiplicándose en éste y en el parénquima hepático durante un período de incubación entre 2 y 30 días según sea el caso, circulando en la sangre y provocando leptospiremia por al menos 7 días (Ellis, 1994), produciendo pirexia, eliminación de leptospiras en la leche, anorexia, daño funcional de algunos órganos (hígado, bazo o cerebro) (Thiermann, 1984; Timoney et al, 1988; citados por Sandow y Ramírez, 2005), especialmente en animales jóvenes (Ellis, 1994). La aparición de anticuerpos

específicos detectables aproximadamente a los 10 días de la infección (Ellis, 1994) junto a la acción leptospiricida de las beta-macroglobulinas del suero y la acción del complemento y la lisozima (Timoney *et al.*, 1988; citados por Sandow y Ramírez, 2005), hacen que desaparezcan las leptospiras en torrente sanguíneo (Ellis, 1994) pero, se localizan en diferentes órganos, tales como: la cámara anterior del ojo, las meninges, el riñón (donde los anticuerpos tienen poco acceso) y en el útero grávido (esto hace que se produzca aborto).

Los signos de la enfermedad aguda generalmente coinciden con la fase de leptospiremia (Ellis, 1994; Heath y Johnson, 1994) pudiendo atribuirse a la existencia de determinados factores de patogenicidad bacteriana, como las hemolisinas y las lipasas (Heath y Johnson, 1994) siendo la primera, causa de la anemia (Timoney *et al.*, 1988; Prescott, 1993; citados por Sandow y Ramírez, 2005). Estos factores son más frecuentes en determinados serovares como: pomona o grippotyphosa (Timoney *et al.*, 1988; citados por Sandow y Ramírez, 2005). Más tarde, se le suma la acción de los anticuerpos situados en la superficie eritrocitaria que sensibilizan al eritrocito, causando su ruptura. Durante esta fase (leptospiremia) ocurre una reacción inflamatoria en la mama produciendo mastitis (Timoney *et al.*, 1988; Prescott, 1993; citados por Sandow y Ramírez, 2005).

Tras esta fase, las leptospiras se acantonan en el riñón, lugar de difícil acceso para los anticuerpos, la ubicación en los túbulos renales se ve facilitada por la producción de ureasa por parte de las Leptospiras (Kadis y Pugh, 1974). Posteriormente, se multiplican en la luz de los túbulos contorneados renales (Michna, 1970; Timoney *et al.*, 1988; citados por Sandow y Ramírez, 2005),

principalmente en las proximidades de la microvellosidades (Timoney *et al.*, 1988; citados por Sandow y Ramírez, 2005), donde la nefritis provocada por el daño capilar y la producción de determinadas endotoxinas y hemolisinas, terminan por producir anoxia anémica y nefrosis hemoglobinúrica, por la posible isquemia debida a la agregación intravascular de hemoglobina que obstruiría los capilares y también por la presencia de mononucleares infiltrados por una reacción autoinmune (Thompson y Manktelos, 1989), lo que da lugar a la tercera fase (leptospiruria) que puede tener carácter continuo o intermitente y de duración variable según la especie afectada (Jawetz *et al.*, 1985; Ellis, 1994; Bofill *et al.*, 1996; citados por Sandow y Ramírez, 2005). El bovino puede tener una leptospiruria hasta 7 meses; equino de 2-3 meses, el cerdo hasta un año; perro hasta 6 meses o más; roedores toda la vida (Pelezary, 1976; Jawetz *et al.*, 1985; Bofill *et al.*, 1996; citados por Sandow y Ramírez, 2005).

Después de la invasión sistémica, se puede producir el aborto por muerte fetal, con o sin degeneración placentaria. El aborto ocurre normalmente varias semanas después de la septicemia debido al tiempo necesario para producir los cambios en el feto, que normalmente experimenta autólisis antes del parto. El aborto ocurre más comúnmente en la segunda parte de la gestación, debido probablemente a la mayor facilidad de invasión de la placenta en esta fase, pero puede ocurrir en cualquier momento desde el cuarto mes (Radostits *et al.*, 2002). Siempre hay que tener en cuenta que, en algunos casos, la aparición del aborto es muy posterior al momento de la infección (Ellis, 1994; Heath y Johnson, 1994).

Luego de la infección, se inducen anticuerpos específicos que opzonizan las leptospiaras, facilitando su eliminación de la mayor parte del organismo. Sin embargo, las leptospiaras que alcanzan los túbulos renales proximales, el aparato genital y las glándulas mamarias parece que están protegidas de los anticuerpos circulantes. Estas bacterias persisten y se multiplican en estos lugares y pueden eliminarse y transmitirse a los animales en contacto susceptibles, principalmente por la orina. Además, y más importante, es que el nivel de anticuerpos séricos normalmente disminuye hasta niveles no detectables en los animales que están infectados persistentemente (Radostits *et al.*, 2002).

La primera respuesta serológica en caso de infección por *L. hardjo* es la producción de inmunoglobulinas M (IgM). Estos anticuerpos aumentan rápidamente pero normalmente descienden hasta concentraciones no detectables a las 4 semanas de la infección. Al cabo de 1 a 2 semanas de la infección, se detectan los anticuerpos IgG y a los 3 meses, representan el 80% de los anticuerpos detectados en la prueba de aglutinación microscópica (AM) (Radostits *et al.*, 2002).

2.6 Signos clínicos

La leptospirosis en los bovinos puede ser aguda, subaguda o crónica y normalmente es causada por *L. pomona* o *hardjo* (Radostits *et al.*, 2002).

2.6.1 Forma aguda

La leptospirosis aguda con *L. pomona* es más frecuente en los terneros pero se puede ver en las vacas lecheras adultas. Los terneros tienen un comienzo agudo de fiebre (40.5-41.5 °C), septicemia, anemia hemolítica, hemoglobinuria, inapetencia, frecuencias cardíaca y respiratoria aumentadas, y abatimiento. También son posibles hemorragias petequiales e ictericia. La mortalidad es elevada en los terneros menores de 2 meses de edad. Las vacas adultas con infecciones agudas por *L. pomona*, son septicémicas, tienen fiebre elevada y un cese completo del flujo de leche acompañada de una ubre laxa con característica secreción mastítica espesa, que es de color rojo, naranja o amarillo oscuro en todos los cuarterones. Las vacas adultas pueden manifestar hemoglobinuria y pueden abortar durante la fase septicémica (Radostits *et al.*, 2002; Rebhun, 1999).

2.6.2 Forma subaguda

Difiere de la forma aguda sólo en el grado, se observan signos clínicos similares en numerosos animales afectados, pero no todos los signos se presentan en el mismo animal. La fiebre es más baja (39-40.5°C) y la apatía, la anorexia, la disnea y la hemoglobinuria son comunes, pero la ictericia puede o no estar presente. El aborto ocurre normalmente de 3 a 4 semanas después de la infección. Uno de los signos característicos es el descenso acentuado de la producción láctea y el aspecto sanguinolento o de color amarillo anaranjado de la leche, que es espesa en los cuatro

cuartos, a la palpación pueden parecer normales sin que existan cambios físicos aparentes en la ubre (Radostits *et al.*, 2002).

2.6.3 Forma crónica

Casi siempre está relacionada con *L. hardjo* y en algunos casos con *L. pomona*, sin manifestación clínica (Radostits *et al.*, 2002). Caracterizada por la aparición de abortos en el último trimestre de la gestación, los terneros infectados en el útero durante las fases terminales pueden nacer débiles o muertos (autolisados). Los animales infectados pueden eliminar el organismo en su orina durante un período de 28 a 40 semanas (Rebhun, 1999).

2.7 Diagnóstico

Puede ser complicado, debido a las características intrínsecas de las leptospiras y a la epidemiología de la enfermedad (Ellis, 1994). En la actualidad, se cuenta con un gran número de técnicas laboratoriales diferentes, pero previamente a la realización de las mismas, es conveniente recabar información sobre una serie de datos que nos pueden orientar en el diagnóstico.

2.7.1 Diagnóstico epidemiológico

La anamnesis debe incluir datos sobre la época del año en que apareció el brote, la aptitud del rebaño, el estado sanitario del mismo, el contacto con otras especies domésticas, la sintomatología predominante y si se realiza vacunación frente a la leptospirosis. Asimismo, deberá obtenerse

información sobre el número de animales afectados, la edad de los mismos y la fase de gestación en que se produce el aborto (Alonso *et al.*, 2001).

2.7.2 Diagnóstico clínico

La mayoría de las infecciones por *Leptospira spp.* cursan de manera subclínica, aunque en algunas ocasiones, pueden darse casos de enfermedad grave. La sintomatología es inespecífica y común a un gran número de afecciones, observándose ictericia, hemoglobinuria, hematuria, evidencias de daño renal, meningitis e incluso mortalidad (Ellis, 1994).

Las hembras preñadas pueden abortar debido a la pirexia mantenida (Michna, 1970, citado por Alonso *et al.* 2001) y la producción láctea prácticamente desaparece. La leche que parece calostro puede contener coágulos de sangre y el recuento de células blancas es muy alto. Las ubres parecen normales o algo blandas al tacto y los cuatro cuartos se muestran afectados (Ellis, 1994). Por el contrario, debe sospecharse de leptospirosis crónicas en casos de fallos reproductivos tales como la infertilidad (abortos, mortinatos), nacimiento de terneros prematuros, retención de placenta, e incluso esterilidad, en casos extremos (Michna, 1970; citado por Alonso *et al.* 2001).

Las lesiones no son patognomónicas, siendo de escasa utilidad para el diagnóstico de la enfermedad (Baskerville, 1986; citado por Alonso *et al.* 2001). En los animales adultos, las lesiones se localizan principalmente en

los riñones, siendo éste uno de los órganos más afectados. También, se pueden encontrar lesiones en el hígado, útero, placenta y, en algunos casos, en pulmones y bazo. En todos los órganos, las características de las lesiones van a depender del serovar implicado (Thiermann, 1982; Skilbeck *et al.*, 1988). En el feto, las lesiones son realmente difíciles de interpretar, pues pueden confundirse con los procesos normales de autólisis (Ellis, 1994).

2.7.3 Diagnóstico laboratorial

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico laboratorial se pueden dividir en dos grandes grupos: técnicas indirectas, basadas en la detección de anticuerpos frente a las leptospiras, y técnicas directas que se basan en la detección de leptospiras o sus antígenos y/o ácidos nucleicos en los tejidos y/o fluidos corporales. En el caso de muestras procedentes de fetos, las técnicas directas están más indicadas que las indirectas, ya que el diagnóstico individual cobra mayor importancia. En el caso de muestras de animales adultos, las técnicas indirectas se utilizan más frecuentemente, pues son más sencillas de realizar y su costo es menor (Ellis, 1986; citado por Alonso *et al.* 2001).

La demostración de la presencia de leptospiras en la sangre, tejidos y/o leche de animales con signos clínicos, tiene un gran valor diagnóstico (Ellis, 1986, citado por Alonso *et al.* 2001). En el caso de animales muertos o sacrificados, las muestras que se debe enviar son cerebro, médula espinal,

líquido cefalorraquídeo y ojo en casos con sintomatología nerviosa, y la mayoría de los órganos parenquimatosos en los casos que cursan con ictericia (Ellis, 1986; citado por Alonso *et al.*, 2001). En animales vivos, se enviará sangre y leche en la fase aguda de la enfermedad y orina en la fase crónica. En los fetos los órganos de elección son el hígado, riñón, cerebro, glándula adrenal y pulmón, así como cualquier fluido interno (Ellis, 1996; citado por Alonso *et al.*, 2001).

Dentro de las técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos, las más utilizadas han sido las técnicas de hibridación con sondas de ADN marcadas y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), actualmente la técnica más eficaz para la detección de leptospiras en la orina (Millar *et al.*, 1987; Bolin *et al.*, 1989; Van Eys *et al.*, 1989). La técnica de inmunofluorescencia, es sin duda, la más utilizada, útil para la detección de leptospiras en la orina (Bolin *et al.*, 1989), pero principalmente para su detección en tejidos fetales, ya que el aislamiento a partir de los mismos es difícil, debido a que por los procesos de autólisis las leptospiras pierden su viabilidad. El aislamiento es, para muchos autores, la técnica más sensible para el diagnóstico de la leptospirosis aguda y crónica, tanto en medio de cultivo, como por inoculación en animales de experimentación. Su mayor desventaja es que requiere mucho tiempo y laboratorios especializados (Thiermann, 1983).

Las técnicas serológicas son las pruebas laboratoriales más utilizadas tanto para el diagnóstico como para la realización de estudios epidemiológicos. Su mayor desventaja es que los niveles de anticuerpos, aunque pueden mantenerse durante años, alcanzan niveles indetectables, incluso en el momento del aborto, puesto que éste suele producirse tiempo después de la infección. Además, en el caso de infección por serovares adaptados, el animal puede no presentar respuesta de anticuerpos detectables (Ellis, 1996; citado por Alonso *et al.* 2001).

La técnica más utilizada es la aglutinación microscópica o MAT (*Microagglutination Test*) (Thiermann, 1984; citado por Alonso *et al.*, 2001), siendo además, la prueba oficial para la exportación e importación de animales (OIE, 1992; citado por Alonso *et al.*, 2001). Entre sus principales desventajas tenemos que no diferencia entre anticuerpos vacunales y de infección y que utiliza como antígenos leptospiras vivas, siendo tedioso el mantenimiento de las cepas y un riesgo potencial para el personal del laboratorio. Para obtener una sensibilidad adecuada, se deben utilizar como antígenos cepas representativas de todos los serogrupos presentes en el país o región y de todos los serovares adaptados a la especie objeto de estudio (Ellis, 1986; citado por Alonso *et al.*, 2001). El MAT se utiliza también para la serología fetal, considerándose un resultado significativo, a obtención de títulos frente a cualquier serovar mayores o iguales a 1:40. Desafortunadamente, el número de fetos que presentan una reacción inmune humoral detectable, es bajo (Barr y Anderson, 1993).

Además del MAT, se pueden encontrar otras técnicas serológicas como la fijación del complemento (Smith *et al.*, 1994), la aglutinación macroscópica, prácticamente abandonada (Ellis, 1986; citado por Alonso *et al.*, 2001), o el ELISA. Esta última, se utiliza tanto para la detección de anticuerpos en leche como en el suero, permitiendo además diferenciar entre IgG e IgM (Thiermann, 1983; Smith *et al.*, 1994). Además, presenta otras ventajas frente al MAT, como es el hecho de no presentar riesgo sanitario para los operarios, ser de fácil estandarización y ser una prueba en la que las reacciones cruzadas son poco frecuentes. Entre sus principales desventajas se mencionan que normalmente son serovar específicos, con lo cual no obtendremos información acerca de una posible infección por otros serovares, y que no permite diferenciar entre anticuerpos vacunales y de infección. A pesar de ser eficaz y de estar considerada en la actualidad como la prueba serológica más sensible, aún no está admitida como prueba oficial (Thiermann, 1983; Thiermann y Garret, 1983).

2.7.4 Diagnóstico histopatológico

Según Jubb *et al.* (1985), los cambios histológicos en la leptospirosis bovina no son prominentes ni específicos. El edema en los pulmones es aparente y en grupos dispersos de alvéolos y vasos linfáticos del tabique hay cintas delgadas de fibrina. En el hígado se produce necrosis zonal; generalmente es centro lobular y es en forma típica un cambio de anoxia anémica severa. Las células de Kupffer están hiperplásicas, contienen cantidades excesivas de hemosiderina y hay una infiltración celular difusa pero leve en las triadas

portales. En la infección causada por *L. icterohaemorrhagiae* es más probable que se produzca la necrosis en el hígado y la disociación de los cordones hepáticos.

En los riñones la nefritis intersticial aguda se caracteriza por una aparición clínica aguda e histológicamente por edema intersticial, infiltración leucocitaria y necrosis tubular focal. En la nefritis intersticial crónica hay infiltración de células mononucleares, fibrosis intersticial y atrofia tubular generalizada.

Los fetos abortados no muestran cambios específicos aunque a veces los organismos pueden ser demostrados en los tejidos fetales. La placenta puede mostrar cambios microscópicos leves de placentitis; hay una tendencia para que quede retenida indebidamente. Los microorganismos pueden ser visualizados en muestras de tejidos mediante la técnica histoquímica de Levaditti o Warthin-Starry (impregnación argéntica) (Jubb *et al.*, 1985).

2.7.5 Diagnóstico diferencial

Debe diferenciarse de cualquier enfermedad del ganado bovino que curse con hemoglobinuria, aborto y disminución de la producción de láctea con aparición de mamitis. La forma hemolítica de la leptospirosis puede confundirse con otros procesos que cursen con hemólisis, hematuria, hemoglobinuria y daño hepatorenal, tales como envenenamiento por nabos

y coles silvestres, babesiosis, anaplasmosis y hemoglobinuria postparto. El aborto por leptospirosis tan sólo podrá diferenciarse del producido por otras causas mediante pruebas laboratoriales (diarrea viral bovina, neosporosis, brucelosis) (Alonso *et al.* 2001).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Población y área de estudio

La población en estudio estuvo conformada por todos los bovinos de la Estación Experimental del Illpa-INIA (73 hembras) y de la Ganadería Cárdenas (25 hembras y 5 machos), con un total de 103 animales, cuyas edades fluctuaban entre los 2 meses y 13 años de edad, el tipo de explotación lechera en ambos casos es semiextensiva (alimentación a base de pastos, agua de acequias y riachuelos, suplementación con alimento concentrado), la procedencia de los animales es local, predominando la raza Brown Swiss. La producción lechera media es de 8 litros en la Estación Experimental del INIA y de 6 litros en la Ganadera Cárdenas, cabe mencionar además, la presencia de otros animales en ambos casos, como perros y ratones en la EE INIA, y perros y cerdos en Mañazo.

El departamento de Puno se ubica en la zona sur oriental del Perú, en la Meseta del Collao. Cuenta con unidades geográficas como los Andes, que representa aproximadamente el 75% de la superficie departamental y está conformado por el altiplano, laderas, áreas intermedias y la cordillera. La selva, que representa el 25% de su territorio, es poco habitada y está escasamente integrada a la economía departamental. El clima de la región andina es frío y seco, con temperaturas que van desde los 5°C a 13°C, con una estación lluviosa de 4 meses de duración (diciembre a marzo). En la selva el clima es templado con una temperatura de 15°C a 22°C. Los recursos hídricos están constituidos por el lago

Titicaca, 50 lagunas y más de 300 ríos. Existe además un importante potencial de aguas subterráneas (Perúinfo, 2006).

La investigación se llevó a cabo en la provincia de Puno, en el predio del INIA-Puno (Estación Illpa), distrito de Paucarcolla, ubicado a una latitud de 15°50'15", Longitud 70°01'18" y altitud 3 827 m.s.n.m. y en el Centro Ganadero Cárdenas, distrito de Mañazo, ubicada a una Latitud 15°47'54", Longitud 70°20'28" y Altitud 3 926 m.s.n.m. La temperatura media durante la época de lluvias (diciembre a marzo) es de 13°C y el índice de precipitación pluvial es de 625.5 mm (Cotacora, 1998; citado por Miranda, 1998).

No existen registros que permitan medir los índices productivos y reproductivos de estos animales. Asimismo, los programas sanitarios no son llevados a cabo con la frecuencia recomendada (comunicación personal con el Dr. Wilfredo Huanca).

3.2 Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas durante los meses de febrero y marzo del 2005 (época de lluvias). La sangre fue obtenida de la vena caudal, mediante el sistema de vacutainers asépticos de 5 ml; inmediatamente se procedió a la separación de los sueros mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de sueros fueron colocados en viales asépticos dentro de una caja térmica conteniendo hielo para su conservación y traslado al Laboratorio de Medicina

Veterinaria Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM en Lima, donde fueron almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

3.3 Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Se utilizó para el diagnóstico, la técnica de Aglutinación Microscópica (MAT), considerada prueba de referencia por la O.I.E. para la leptospirosis.

3.3.1 Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)

La prueba de aglutinación microscópica tiene como objetivo enfrentar diluciones seriadas de suero problema con igual volumen de una suspensión de antígeno a fin de detectar, mediante observación microscópica en campo oscuro, la reacción antígeno-anticuerpo manifestada como aglutinación. Se usa antígenos vivos de *Leptospira* cultivados en laboratorio, la batería utilizada en el presente trabajo estuvo representada por los serovares más prevalentes del área o en su defecto de por lo menos una cepa de referencia de los serovares más representativos de las especies más frecuentes según recomendación de la OMS.

Materiales y equipos

Microplacas.

Micropipetas de rango graduable.

Reloj.

Puntas para micropipetas.

Láminas porta objetos.

Suero fisiológico.

Pipetas Pasteur.

Pipetas terminales.

Pipeta multicanal.

Cabina flujo laminar.

Contenedor de material contaminado.

Tubos con medio de cultivo Fletcher.

Tubos con medio de cultivo EMJH.

Estufa 28 °C- 30 °C.

Pipeteador automático.

Microscopio de campo oscuro.

Guantes de latex.

Aceite de inmersión.

3.3.2 Antígeno utilizado

Se utilizó una batería compuesta por 4 serovares, correspondientes a 4 serogrupos de *Leptospira interrogans*, cultivados, replicados y evaluados previamente a la realización de la prueba.

Los serovares investigados fueron *L. canicola*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. hardjo*, con el fin de detectar infecciones recientes o residuales que orientaran hacia la búsqueda de la circulación de la bacteria en la zona de estudio.

3.3.3 Tamizaje

Utilizando microplacas de 96 pocillos, se realizó una dilución de 1:50 usando 245 μ l de suero fisiológico y 50 μ l del suero problema, después de mezclar durante 20 veces se procedió a pasar 50 μ l de la dilución anterior a la siguiente fila a la cual se le agregó 50 μ l más de suero fisiológico obteniéndose así una dilución de 1:100, esta segunda dilución, se mezcló también durante 20 veces y se eliminó 50 μ l de la misma. A esta nueva dilución de 1:100 se le agregó una gota de antígeno (50 μ l aprox.), correspondiente a cada serovar, se homogenizó y se llevó a incubadora a 28°C durante 2 horas.

La lectura se realizó utilizando el microscopio de campo oscuro con objetivo de 10X, colocando 10 μ l de cada dilución antígeno-suero en una lámina portaobjetos. Se midió el grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antígeno control utilizando la siguiente escala:

- + 25% de aglutinación con 75% de células libres.
- ++ 50% de aglutinación con 50% de células libres.
- +++ 75% de aglutinación con 25% de células libres.
- ++++ 100% de aglutinación o lisadas con 0-25% de células libres.

Los sueros considerados positivos, fueron aquellos que a la observación en microscopio de campo oscuro presentaron aglutinación igual o mayor al 50% a por lo menos un serovar (dilución 1:100). Fueron considerados

sueros negativos todos aquellos que no presentaron aglutinación con ningún serovar, observándose igual al antígeno control.

3.3.4 Titulación de anticuerpos

Los sueros encontrados positivos en el tamizaje fueron titulados a partir de la dilución 1:100. La microplaca fue rotulada con el código de los serovares en las columnas y las diluciones correspondientes en cada fila, empezando por la dilución 1:50 y siguiendo con las diluciones 1:100, 1:200 hasta la dilución 1:1600. Se colocó 50 μ l de suero fisiológico a cada pocillo a partir de la segunda fila y se agregó a la segunda fila 50 μ l de la dilución 1:50 utilizando la pipeta multicanal, siguiendo el mismo proceso se homogenizó el suero diluido de la segunda fila, traspasando 50 μ l a la tercera fila y así sucesivamente a lo largo de la columna, descartando los últimos 50 μ l para utilizar la última fila como control del antígeno. En cada fila agregar 50 μ l del antígeno correspondiente, posteriormente se homogenizó la microplaca e incubó a 28°C durante 2 horas.

Se repitió el procedimiento para la lectura en el microscopio de campo oscuro, el título final fue dado por la mínima dilución de suero.

3.4 Análisis de datos

Se calculó la prevalencia de la prueba haciendo uso de la siguiente fórmula:

(Ahlbom y Norell, 1992)

$$p (\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sueros positivos}}{\text{N}^\circ \text{ de sueros analizados}} \times 100$$

Los resultados son expresados en forma porcentual, realizándose las comparaciones entre los diversos grupos según las variables analizadas.

III. RESULTADOS

De las 103 muestras de suero procesadas, tres fueron positivas a anticuerpos contra leptospira mediante la prueba serológica de microaglutinación (MAT); representando una prevalencia de 2,91% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de bovinos reactivos a leptospirosis de acuerdo a procedencia según la prueba de microaglutinación (MAT). Puno. 2005.

PROCEDENCIA	NÚMERO DE ANIMALES	REACTORES	
		x	%
Estación Illpa	73	2	2,74
Ganadera Cárdenas	30	1	3,33
TOTAL	103	3	2,91

x: número de animales positivos a la prueba.

%; porcentaje de animales positivos.

En los tres animales serorreactivos, el serovar involucrado fue *Leptospira icterohaemorrhagiae*, con un título máximo de 1:200, obtenido en un animal de 5 meses de la localidad de Mañazo (ganadera Cárdenas). Los títulos mínimos fueron de 1:100, obtenidos en dos bovinos de 2 y 4 años procedentes de la localidad de ILLPA.

Como puede observarse en el cuadro, la prevalencia en la ganadería Cárdenas (3,33%) es mayor que la observada en la Estación Illpa (2,74%), sin embargo, esto no necesariamente significa un mayor riesgo en la ganadería Cárdenas, pues al observarse las poblaciones, la Estación Illpa tiene una población que supera ligeramente el doble de la ganadería Cárdenas y los reactores están en la relación indicada (2 a 1).

Los resultados de la evaluación de la variable edad en los animales procedentes de la Estación Experimental Illpa-INIA, se presentan en el Cuadro 2; observándose que entre los del grupo de hasta dos años, sólo se obtuvo un reactor, igualmente, en los vacunos de más de 2 hasta 4 años, hubo un solo positivo, no detectándose ningún animal reactor entre los mayores de 4 años.

Cuadro 2. Distribución de bovinos reactores a leptospirosis según edad, mediante la prueba de microaglutinación (MAT). Illpa. Puno. 2005.

EDAD (años)	NÚMERO DE ANIMALES	REACTORES	
		x	%
Hasta 2	25	1	4,00
Más de 2 hasta 4	23	1	4,35
Más de 4	25	0	0
TOTAL	73	2	2,74

x: número de animales positivos a la prueba.
%: porcentaje de animales positivos

Si bien es cierto hay diferencias entre los estratos no puede aseverarse existencia de mayor riesgo en ninguno, debido a la presencia de un solo reactor en dos grupos etéreos y ausencia en el otro.

El mismo análisis realizado con los animales de Mañazo, se presenta en el Cuadro 3, donde se observa un solo animal reactor que corresponde al grupo de dos años o menos, no pudiéndose concluir diferencia alguna si se consideran los tamaños de poblaciones específicas, pues el estrato con un animal positivo es el doble de otro grupo y cinco veces superior al otro.

Cuadro 3. Distribución de bovinos reactores a leptospirosis según edad, mediante la prueba de microaglutinación (MAT). Ganadera Cárdenas. Puno. 2005.

EDAD (años)	NÚMERO DE ANIMALES	REACTORES	
		x	%
Hasta 2	18	1	5,56
Más de 2 hasta 4	9	0	0
Más de 4	3	0	0
TOTAL	30	1	3,33

x: número de animales positivos a la prueba.

%: porcentaje de animales positivos

IV. DISCUSIÓN

La prevalencia determinada en el presente estudio es baja, hallazgo que resalta, pues según antecedentes de la enfermedad se esperaba un nivel superior; así, Vieira (2005) señala que la leptospirosis encabeza la lista de las principales enfermedades responsables de abortos en las vacas, afectando a gran parte del rebaño mundial, llegando al 80% en el Brasil. Asimismo, niveles altos fueron determinados en Venezuela por Godoy *et al.*, (1997) con un 41,75% para *hardjo* y 32,96% para *hebdomadis* y por Lugo *et al.*, (2001), con un 77,9%; en Colombia Ochoa *et al.*, (2000) obtuvo un 60,9% de vacas reactoras; y en Brasil Langoni *et al.*, (2000) y Nilson (2003) obtuvieron una prevalencia de 47,54% y 52,4% respectivamente.

La transmisión de la leptospirosis está influenciada por factores climáticos como la humedad y la temperatura, condiciones que permiten a la bacteria sobrevivir fuera del hospedador, favoreciendo así, la transmisión indirecta; esto puede explicar que la mayor frecuencia encontrada corresponda a la región tropical húmeda, mientras que en los climas áridos la transmisión se realiza al entrar los animales en estrecho contacto y propiciar la transmisión directa entre ellos (Alonso *et al.*, 2001). En el altiplano peruano el clima es seco, las temperaturas son extremas, la vegetación y las lluvias estacionales y muchas veces muy escasa, resultando por lo tanto adversas para la supervivencia de leptospiras patógenas (Macedo y Hung, 1993); sin embargo, estudios realizados en esta región demuestran la existencia de leptospirosis en alpacas

-criadas conjuntamente con bovinos, llamas, ovinos y cerdos- obteniéndose el mayor número de animales infectados durante la época lluviosa (Herrera *et al.*, 2000). Puede mencionarse también que Sadow y Ramírez (2005), encontraron un número mayor de bovinos y hombres positivos a leptospirosis durante la época de seca, llegando a la conclusión de que las precipitaciones tienen un comportamiento contrario a lo planteado por diversos autores, ya que en este caso específico, las pocas lluvias tienden a concentrar las fuentes de infección y no pueden arrasar consigo la superficie del suelo por tener menor fuerza y así convierten esta agua en diluyentes de los lugares infectados con orina de roedores, perros y cerdos.

Como en otras pruebas serológicas, una de las dificultades en la interpretación de los resultados de la microaglutinación reside en la determinación del punto de corte. El más recomendado por los autores es 1:100, pero no siempre resulta adecuado, en especial cuando se consideran serovares adaptados como *Leptospira hardjo*, en cuyo caso la respuesta inmune puede no ser detectada, incluso en el momento del aborto (Timoney *et al.*, 1988). Por otro lado, la prueba de microaglutinación se utiliza para la serología fetal, considerándose un resultado significativo, la obtención de títulos frente a cualquier serovar, en diluciones iguales o mayores a 1:40. Desafortunadamente, el número de fetos que presenta una reacción inmune humoral detectable, es bajo (Barr y Anderson, 1993). Fue interesante no encontrar animales positivos a *Leptospira hardjo*, teniendo en cuenta que el bovino es el reservorio de mantenimiento de este serovar, de enorme difusión

mundial. Radostits *et al.*, (2002) mencionan que en los animales infectados persistentemente (crónicos), los títulos de anticuerpos pueden disminuir a niveles no detectables y que la prueba de microaglutinación no es útil para diagnosticar enfermedades causadas por serovares adaptados al hospedador.

En nuestro país, no se cuenta con información sobre la situación de la leptospirosis en ganado bovino del altiplano, pues los estudios más recientes en esta región, fueron realizados en alpacas por Macedo y Hung (1993) y por Herrera *et al.*, (2000). En el estudio efectuado por Macedo y Hung, el 100% de animales evaluados fueron reactores a uno o más serovares de leptospira, siendo la reacción más frecuente frente a *L. castellonis* del serogrupo Ballum con 70% de animales positivos, *L. andama* (8% de positivos) y otros serovares en 6% de alpacas. Por otro lado, Herrera *et al.*, obtuvieron un total de 53 alpacas rectoras (6,54%) al evaluar 810 animales durante el período 1993-1996 (comparando las épocas de lluvia y seca); siendo los serovares evaluados: *Butembo*, *Cynopteri*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Shermani*, *Patoc* y *Pomona*; de todas estas, el serovar más frecuente fue *Pomona* (79,24%). En general estos resultados demuestran las diferentes serovariedades encontradas en esta región, sería recomendable mantener una buena batería con diversos antígenos para el diagnóstico adecuado en la zona.

Aunque la leptospirosis en animales domésticos es una enfermedad de difícil erradicación, es necesario buscar estrategias que disminuyan las probabilidades de riesgo de su diseminación (roedores), así como las

principales vías de contagio entre los mismos animales, ya sea por contacto directo o indirecto así como por otros animales (perros). Si en el manejo profiláctico de una explotación se considera la vacunación, ésta, no sólo debe de abarcar a los animales de interés (bovinos, cerdos, camélidos, etc.), sino también a los animales que tengan relación con estos (animales de compañía). Obviamente que en cualquier explotación se debe tener además un buen control de animales silvestres y roedores para disminuir aún más la posibilidad de contagio (Sepúlveda *et al.*, 2002).

V. CONCLUSIONES

Se detectó una prevalencia muy baja de anticuerpos contra leptospirosis en bovinos criados en la Estación Experimental Illpa-INIA (distrito de Paucarcolla) y en la ganadería Cárdenas (distrito de Mañazo), Puno; encontrándose sólo tres animales positivos de un total de 103 bovinos muestreados, representando una prevalencia de 2,91%.

El único serovar detectado en estos animales fue *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Los títulos de anticuerpos hallados en los animales positivos fueron muy bajos, siendo el máximo título de 1:200.

En el presente estudio, factores como la edad de los animales y procedencia no representaron variables importantes para el riesgo de infección con leptospirosis.

No se encontró ningún bovino reactor a *L. hardjo*, a pesar de ser éste, su hospedador de mantenimiento.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar nuevos estudios para determinar la presencia de otras serovariedades de *L. interrogans* en el ganado bovino del altiplano, teniendo en cuenta los diferentes serovares encontrados en estudios previos realizados en esta región en otras especies.

Realizar estudios en ganado bovino criado intensiva y extensivamente en la región para determinar si el tipo de crianza es un factor importante dentro de la diseminación de la leptospirosis.

Realizar estudios durante la época de seca para determinar, si en esta región, las lluvias son factores favorables o no a la diseminación de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Acosta, H.; C. Moreno; D. Viáfara. 1994.** Leptospirosis: Revisión de tema. Colombia Med. 25: 36-42.
2. **Ahlbom. A.; S. Norell. 1992.** Fundamentos de epidemiología. 3ª ed. p 7. Ed. Siglo XXI, Madrid, España.
3. **Alonso, C.; F.J. García; L.M. Ortega. 2001.** Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). Invest. Agr. 16(2):205–225.
4. **Barr, B.C.; M.L. Anderson. 1993.** Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. Vet. Clin. North. 9(2): 343-368.
5. **Bolin, C.A.; R.L. Zuerner; G. Trueba. 1989.** Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjo-bovis in bovine urine. Am. J. Vet. Res. 50(7): 1001-1003.
6. **Carrol A.G.; R.S.F. Campbell. 1987.** Reproductive and leptospiral studies on beef cattle in central Queensland. Aus. Vet. J. 64(1): 1-5.
7. **Céspedes, M.; M. Glenny. 2002.** Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Serie de Normas Técnicas N° 34. Ministerio de Salud del Perú. Instituto Nacional de Salud. Perú. 53p.
8. **Céspedes, M.; M. Ormaechea; P. Condori; L. Balda; M. Glenny. 2003.** Prevalencia de Leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de Dios, Perú. Rev. peru. med. exp. salud pública. 4(20): 180-185.
9. **Céspedes, M.; R. Fernández; R. Rimarachín; H. Taype; J. Cenepa; M. Mori; I. Torres; C. Castillo; L. Balda; R. Tapia; D. Gonzales; M. Glenny. 2004.** Leptospirosis: Una enfermedad zoonótica hiperendémica en la provincia de Corone Portillo. Ucayali, Perú. Rev. peru. med. exp. salud pública. 2(21): 62-70.

10. **Ellis, W.A. 1994.** Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North. 10(3): 463-478.
11. **Ellis, W.A.; S.W., Michna. 1976a.** Bovine leptospirosis: demonstration of leptospire of the Hebdomadis serogroup in aborted fetuses and a premature calf. Vet. Rec. 99(22): 430-432.
12. **Ellis, W.A.; S.W. Michna. 1976b.** Bovine leptospirosis: a serological and clinical study. Vet. Rec. 99(22): 387-391.
13. **Ellis, W.A.; S.W. Michna. 1977.** Bovine leptospirosis: experimental infection of pregnant heifers with strain belonging to the Hebdomadis serogroup. Res. Vet. Sci. 22(2): 229-236.
14. **Fernández, J.; V. Reyes; A. de la Peña. 1993.** Detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en bovinos de hatos lecheros del valle de Atlixco, Puebla, mediante la prueba de aglutinación microscópica. Rev. Vet. México, 24(1): 47-49.
15. **Gillespie, R.W.; J. Ryno. 1963.** Epidemiology of leptospirosis. Am. J. Public Health, 33: 950-55.
16. **Godoy, S.; O. Mosquera; C. Sánchez. 1997.** Prevalencia de leptospirosis por época en bovinos doble propósito en el municipio Torres, parroquia Las Mercedes, Estado de Lara. Arch. Latinoam. Prod. Ani. 5 (Supl. 1): 589-591.
17. **Heath S.E.; R. Johnson. 1994.** Leptospirosis. JAVMA, 205(11): 1518-1523.
18. **Herrera, J.; S. Vasconcellos; Z. Moraes; F. Ferreira; S. Sakamoto; J. Ferreira; S. Pinheiro. 2000.** Seropositividade para leptospirose em alpacas criadas no altiplano peruano. Puno, Perú. Análise de associação com o índice pluviométrico. Arq. Inst. Biol, São Paulo, 67(2): 171-176.
19. **Joklin, W.; H. Willet; D. Amos; C. Wilfert. 1997.** Microbiología. 20° Ed. p 909-915. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
20. **Jubb, K.V.; P.C. Kennedy; N. Palmer. 1985.** Patología de los animales domésticos. Vol. II y III, III Ed. en español. p. 162,434. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. Montevideo, Uruguay.

21. **Kadis, S.; W.L. Pugh. 1974.** Urea utilization by leptospira. Infect. Immun. 10(4): 793-801.
22. **Langoni, H.; L. Meireles; S. Gottschalk; K. Cabral; A. Da Silva. 2000.** Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol. 67(1):133-137.
23. **Leonard, F.; P.J. Quinn; W.A. Ellis. 1992.** Possible effect of pH on the survival of leptospires in cattle urine. Vet. Rec. 131(3):53-54.
24. **Leonard, F.C.; P.J. Quinn; W.A. Ellis. 1993.** Association between cessation of leptospirosis in cattle and urinary antibody levels. Res. Vet. Sci. 55(2): 195-202.
25. **Liceras de Hidalgo, J. 1981.** Leptospirosis en Tingo María. Departamento de Huánuco, Perú. II. Estudio en animales silvestres. Bol. Of. Sanit. Panam. 91(1): 47-54
26. **Lugo, S.; R. López; I. Briceño; R. Bolívar; F. Anduela. 2001.** Encuesta seroepidemiológica de la leptospirosis bovina en la región sur del lago de Maracaibo. Venezuela. Años 1998-1999. Rev. Fac. Farm. Univ. de Los Andes, Venezuela, 42 (4): 17-19.
27. **Luna, M.; L. Moles; D. Gavaldón; C. Nava; F. Salazar. 2005.** Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. Rev. Cub. Med. Trop. 57(1): 28-31.
28. **Macedo, S.; A. Hung. 1993.** Leptospirosis: Estudio serológico en alpacas (*Lama pacos*) de la SAIS Picotani-Puno. Rev. Per. de Med. Trop. UNMSM. 7(2): 11-14.
29. **Millar, B.D.; R.J. Chappel; B. Adler. 1987.** Detection of leptospires in biological fluids using DNA hybridization. Vet. Microbiol. 15(1-2): 71-78.
30. **Miller, D.A.; M.A. Willson; G.W. Beran. 1991.** Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic and seasonal factors. Am. J. Vet. Res. 52(11):1766-1768.
31. **Miranda, F. 1998.** Selección de gramíneas forrajeras precoces y resistentes a heladas. Instituto Nacional de Investigación Agraria – INIA. Disponible: <http://www.visionveterinaria.com/articulos/17.htm> (20/11/2005).

32. **Moles, L.; M. Cisneros; D. Gavaldón; N. Rojas; J. Torres. 2002.** Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Rev. Cub. Med. Trop. 54(1): 24-27.
33. **Moles, L.; R. Urrutia; F. Diosdado; A. Morilla. 1998.** Frecuencia de *Leptospira interrogans* en unidades de producción porcina del altiplano de México. Rev. Vet. México, 29(1): 49-52.
34. **Nilson, G. 2003.** Avaliação da infecção por leptospira em fêmeas bovinas enviadas ao abate no norte de Paraná, através de diferentes técnicas diagnósticas. Tesis doctorado. Fac. Med. Veter. Zoot. USP, São Paulo, Brasil. 75 p.
35. **Ochoa, J.; A. Sánchez; I. Ruiz. 2000.** Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Rev. Panamericana de Salud Pública, 7(5): 325-331.
36. **Okasaki, W.; L. Ringen. 1975.** Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. Am J Vet Res, 18:219-33.
37. **Orrego, U. 2005.** Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis bovina. Disponible: <http://www.fedegan.org.co/74manual.html> (20/11/05).
38. **Pachas, P.; R. Cjuno; M. Portugal; B. Tabeada; V. Felices; V. Laguna. 2001.** Seroprevalencia de leptospirosis en humanos y reservorios en la localidad de Koribeni, La Convención, Cusco. Rev. Perú. enf. infec. trop. (1): 87-91.
39. **Perúinfo. 2006.** Información por departamentos, geografía del departamento de Puno. Disponible: http://www.Peru.com/PERUINFO/info_dptos/puno (23/04/2006)
40. **Radostits O.; C. Gay; D. Blood; K. Hinchcliff. 2002.** Medicina Veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. I, IX Ed. en español. p.1150-1168 Edit. McGraw-Hill Interamericana. España.
41. **Rebhun, W. 1999.** Enfermedades del ganado vacuno lechero. p 611-613. Edit. Acribia S. A. Zaragoza, España.

42. **Salamanca-Pinto, C. 1999.** Detección serológica de leptospirosis canina en Arequipa Metropolitana – 1997. Centro de Investigación de la Universidad Católica de Santa María. Rev. Universitas (1): 73-75.
43. **Sadow, K; W. Ramírez. 2005.** Leptospirosis. Centro de Estudios de Prevención y Mitigación de Desastres, Fac. Med. Vet. Universidad de Granma. Cuba. Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos17/leptospirosis.shtml> (01/11/2005)
44. **Selvin, S. 1991.** Statistical analysis of epidemiologic data. p 156. Oxford University Press, Inc. New York, USA.
45. **Sepúlveda, A.; J. Santiago; F. Preciado. 2002.** La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. Rev. Cub. Med. Trop. 54(1): 21-23.
46. **Skilbeck, N.W.; W.M. Forsyth; M. Dohnt. 1988.** Bovine leptospirosis: microbiological and histological findings in cattle at slaughter. Aus. Vet. J. 65(5): 73-75.
47. **Smith, C.R.; P.J. Ketterer; M.R. McGowan; B.G. Corney. 1994.** A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Aus. Vet. J. 71(9): 290-294.
48. **Taype, H.; 2000.** Seroprevalencia de leptospira en humanos y animales reservorios en los sectores de la jurisdicción del Hospital de Apoyo N°2 de Ucayali. Documento interno.
49. **Thiermann A.B. 1982.** Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms o the Hebdomadis serogroup Am. J. Vet. Res. 43(5): 780-784.
50. **Thiermann A.B. 1983.** Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. Am. J. Vet. Res. 44(12): 2244-2245.
51. **Thiermann A.B.; L.A. Garret. 1983.** Enzyme-linked inmunoabsorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona in cattle, Am. J. Vet. Res. 44(5): 884-887.

52. **Thompson, J.C.; B.W. Manktelos. 1989.** Pathogenesis of renal lesions in haemoglobinaemic and non-haemoglobinaemic leptospirosis. J. Comp. Path. 101(2): 201-214.
53. **Timoney, J.F.; J.H. Gillespie; F.W. Scott; J.E. Barlough. 1988.** The Spirochetes, En: Hagan & Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th edition, 45-57.
54. **Tirado, M. 2005.** Leptospirosis bovina. Disponible: <http://www.pcca.com.ve/vb/articulos/e42p49.htm> (21/11/2005).
55. **Vadillo, S.; S. Píriz; E. Mateos. 2002.** Manual de Microbiología Veterinaria. p. 235-251. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.
56. **Van Eys, G.J.J.M.; C. Gravekamp; M.J. Gerritsen; W. Quint; M.T.E. Cornelissen; J. Ter Schegget; W.J. Terpstra. 1989.** Detection of leptospires in urine by polimerasa chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27(10): 2258-2262.
57. **Vieira, L. 2005.** A vilã do sistema reprodutivo. Disponible: <http://ancz.org.br/revista/08/mat40.php3> (21/11/2005).
58. **Vieira, S. 1991.** Introdução à bioestatística. II Ed. P. 114-118. Edit. Campus Ltda. Rio de Janeiro, Brasil.
59. **Word Health Organization. 1999.** Leptospirosis worldwide, 1999. Wkly. Epidemiol. Rec. 74:237-242.
60. **Zuerner, R.L; C.A. Bolin. 1997.** Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS 1500 hybridization and PCR assays. J Clin Microbiol, 35(10): 2612-2617.